



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105814076 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201480067303.3

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2014.12.11

代理人 翟建伟 李炳爱

(30)优先权数据

61/917597 2013.12.18 US

(51)Int.Cl.

G07K 14/605(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/069643 2014.12.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/094875 EN 2015.06.25

(71)申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72)发明人 J.阿尔西纳-费尔南德斯

R.C.卡明斯 郭莉莉

权利要求书1页 说明书9页  
序列表3页

(54)发明名称

用于治疗严重低血糖的新颖的化合物

(57)摘要

本发明提供了可用于治疗低血糖的新颖的化合物。

1. 化合物,其包含如下氨基酸序列:His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2)。

2. 根据权利要求1的化合物,其中所述化合物由如下氨基酸序列组成:His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2)。

3. 药物组合物,其包含根据权利要求1或权利要求2的化合物以及药学上可接受的缓冲液。

4. 根据权利要求3的药物组合物,其中所述药学上可接受的缓冲液是组氨酸缓冲盐水。

5. 在个体中治疗低血糖的方法,其包括施用有效量的根据权利要求1或权利要求2的化合物。

6. 根据权利要求1或权利要求2的化合物,其用于治疗。

7. 根据权利要求1或权利要求2的化合物,其用于治疗低血糖。

8. 根据权利要求1或权利要求2的化合物,其用于制造治疗低血糖的药物。

## 用于治疗严重低血糖的新颖的化合物

[0001] 本发明涉及一种化合物,其相对于人胰高血糖素具有改进的溶解度及物理和化学稳定性,用于治疗糖尿病和/或肥胖症。

[0002] 人胰高血糖素,具有以下氨基酸序列: His-Ser-Gln-

Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-

Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1)是产于胰腺的29个氨基酸的肽激素。当血糖开始下降时,胰高血糖素向肝脏信号传导以将存储的糖原分解成葡萄糖以释放到血流中,造成血糖水平升高。

[0003] 在患有糖尿病的个体中,低血糖可能作为糖尿病治疗的副作用出现。此外,糖尿病患者体内对低血糖的天然胰高血糖素应答可能受损,使得葡萄糖水平更难以回到正常范围。如果放任不管,严重或急性低血糖可能引起严重问题,如癫痫、意识不清、脑损伤或甚至死亡。

[0004] 施用胰高血糖素是用于治疗急性低血糖的已确立的疗法。紧急施用胰高血糖素可以在施用后的数分钟内恢复正常的葡萄糖水平。然而,为施用而制备的胰高血糖素存在若干问题。在处于或接近生理pH的含水缓冲液中,胰高血糖素的溶解性差。当在低或高pH配制时,胰高血糖素还表现出化学稳定性差和物理稳定性差,如胶凝现象和可溶聚集体的形成。为了使这些问题最小化,现有的商用胰高血糖素产品是以冻干粉剂提供的,并附有在施用时的说明书。在紧急情况下,重构冻干粉剂既累赘又不方便。因此,期望提供一种治疗用的化合物,其能在生理条件下保持人胰高血糖素的生物性能,同时非生理条件下也表现出足够的水溶性、化学稳定性和物理稳定性。

[0005] 在W02008086086中公开了具有氨基酸取代的胰高血糖素类似物以改进溶解度以及在酸性和生理pH缓冲液中的稳定性。仍然需要一种化合物,其能在生理条件下保持人胰高血糖素的生物性能,同时非生理条件下也表现出足够的溶解度以及化学和物理稳定性。

[0006] 因此,本发明提供一种化合物,其保持野生型胰高血糖素活性同时还表现出足够的溶解度以及化学和物理稳定性。本发明还提供了适于泵送和/或紧急施用的化合物。此外,本发明提供了可与速效胰岛素类似物在双腔泵中联合施用以提供闭环血糖控制的化合物。

[0007] 本发明提供了包含氨基酸序列

His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-Lys-

Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-

Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2)的化合物。本发明还提供了由氨基酸序列

His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-Lys-

Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-

Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2)组成的化合物。出人意料地发现,相比人胰高血糖素,

本发明的化合物在水溶液中展示出增强的水溶性、增强的化学稳定性和减少的原纤化(fibrillation)。此外,本发明的化合物在5-7范围内的pH下表现出增大的溶解度。本发明的化合物还提供了与人胰高血糖素类似的活性 - 例如,相比于人胰高血糖素的效力、作用时间和在胰高血糖素受体处的选择性。因此,本发明的化合物适用于治疗低血糖,包括严重或急性低血糖。本发明的化合物改进的特性还使得能够在水溶液中制备胰高血糖素以用于泵送施用以及治疗严重低血糖。

[0008] 本发明进一步提供了在个体中治疗低血糖的方法,包括施用包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的化合物。本发明还提供了在个体中治疗低血糖的方法,包括施用由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成的化合物。本发明进一步提供了包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的化合物,其用于治疗。本发明还提供了由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成的化合物,其用于治疗。本发明还提供了包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的化合物,其用于治疗低血糖。本发明还提供了由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成的化合物,其用于治疗低血糖。本发明提供了包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的化合物,其用于制造治疗低血糖的药物。本发明还提供了由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成的化合物,其用于制造治疗低血糖的药物。

[0009] 本发明提供了包含化合物和药学上可接受的缓冲液的药物组合物,所述化合物包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列。本发明还提供了包含化合物和药学上可接受的缓冲液的药物组合物,所述化合物由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成。本发明还提供包含化合物和组氨酸缓冲液的药物组合物,所述化合物包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列。本发明还提供包含化合物和组氨酸缓冲液的药物组合物,所述化合物由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成。本发明还提供包含化合物和组氨酸的药物组合物,所述化合物包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列。本发明还提供包含化合物和组氨酸的药物组合物,所述化合物由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成。本发明还提供包含化合物和组氨酸缓冲盐水的药物组合物,所述化合物包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列。本发明还提供包含化合物和组氨酸缓冲盐水的药物组合物,所述化合物由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成。药物组合物优选为水溶液。如本文中所示,术语“药学上可接受的缓冲液”应当理解为涵盖了本领域技术人员已知的任何标准药用缓冲液。用于肠胃外施用的药学上可接受的缓冲液包括,例如,生理盐水、磷酸盐缓冲盐水、柠檬酸盐缓冲盐水、和组氨酸缓冲盐水。可采用标准的药物配制技术,如在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA中描述的那些。

[0010] 可以使用任何标准施用途径(如肠胃外、静脉内、皮下、肌内或经皮)来施用本发明的化合物。在实施方案中,本发明的化合物皮下或肌内施用。

[0011] 药物组合物可具有生理学上可接受的pH。在实施方案中,药物组合物可具有范围在约4至约8的pH。更优选地,药物组合物可具有约5至约6的pH。

[0012] 本发明的化合物的剂量可以在约0.01 mg至约100 mg的范围内。剂量可在约0.01 mg至约10 mg的范围内。剂量也可在约0.1 mg至约3 mg的范围内。此外,剂量可在约0.01 mg至约0.03 mg的范围内。

[0013] 本发明的化合物可作为药剂盒的一部分提供。在实施方案中,提供了药剂盒连同向个体施用化合物的装置。更优选地,药剂盒包括用于施用化合物的注射器和针头。最优选地,将化合物在注射器内水溶液中预配制。

[0014] 本发明的化合物也可以被用于泵系统,如胰岛素泵或双激素(例如,胰岛素-胰高

血糖素)泵系统。

[0015] 如本文中所用,术语“有效量”应当理解为意指,当向个体施用,产生所需疗效而不会造成不可接受的副作用的量。例如,本发明的化合物的“有效量”是,相比没有治疗的情况,将导致对血糖浓度的更强控制的量。向个体所施用的本发明的化合物的“有效量”可取决于疾病的类型和严重程度,并取决于个体的特性,包括但不限于,总体健康状况、年龄、性别、体重、对药物的耐受性以及无力调节血糖的严重程度。

[0016] 如本文中所用,术语“治疗”应当理解为意指改善与特定病症或状况(如低血糖)相关的症状。

[0017] 本发明的氨基酸序列含有二十种天然存在的氨基酸的标准单字母或三字母代码。另外,“Aib”是 $\alpha$ 氨基异丁酸。

[0018] 如本文中所用,“原纤化(fibrillation)”指代在低或高pH下配制胰高血糖素时所观察到的胶凝现象和可溶聚集体的形成。

[0019] 实施例1:肽合成

SEQ ID NO: 2的化合物是在Protein Technologies Inc. Symphony上通过固相肽合成而生成的。在Fmoc-Rink酰胺聚苯乙烯树脂(Rapp Polymere Tubingen, Germany)上以大约0.68 mmol/g的取代度(substitution)进行合成(0.125 mmol规模)。使用Fmoc主链保护基团策略进行合成。所用的氨基酸侧链衍生物为:Asp(O-叔丁基,OtBu)、Gln(三苯甲基,Trt)、Glu(OtBu)、His(Trt)、Lys(叔丁氧基-羰基,Boc)、Ser(OtBu)、Thr(OtBu)、Trp(Boc)和Tyr(OtBu)。用大约10当量的(equivalents)用在二甲基甲酰胺(DMF)中的二异丙基碳二亚胺(DIC)和羟基苯并三唑(HOBt)(1:1:1摩尔比)活化的氨基酸进行偶联。偶联在室温下进行90分钟至4小时。

[0020] 在含有三氟乙酸(TFA):三异丙基硅烷:1,2-乙二硫醇:水:茴香硫醚 90:4:2:2:2(v/v)的溶液中,于室温下进行从树脂的并行裂解和侧链保护基团移除,持续2 h。将溶液过滤并用冷乙醚沉淀肽,并在4000 rpm离心3 min(将冷乙醚洗涤重复三次)。将粗肽再溶解于40 mL含有10%乙酸的水中并在C<sub>18</sub>反相高效液相色谱(HPLC)柱(Waters SymmetryPrep 7  $\mu$ m, 19  $\times$  300 mm)上以18 mL/min的流速进行纯化。以15至55% B的线性AB梯度经100分钟洗脱样品,其中A = 0.05% TFA/H<sub>2</sub>O,而B = 0.04 % TFA/乙腈。产物通常在约26-28%乙腈时洗脱。在具有单个四极杆MS检测器的Agilent 1100系列液相色谱-质谱(LC-MS)系统上确认了肽的纯度和分子量。分析型HPLC分离是在Waters SymmetryShield RP18, 3.5 $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  100 mm 柱上,以10至100% B的线性AB梯度经15分钟完成的,其中A = 0.05 % TFA/H<sub>2</sub>O,而B = 0.04 % TFA/ 40% H<sub>2</sub>O/60% 乙腈,并且流速为0.7 mL/min(波长220 nm)。将化合物纯化至> 95%的纯度,并确认具有对应于1个原子质量单位(amu)以内的计算值的分子量。

[0021] 使用AG 1-X8树脂(Bio-RAD,乙酸盐形式(acetate form),100-200目,3.2 meq/g,含水量39-48 wt%)(阴离子交换树脂)将TFA盐转换成乙酸盐。例如,将422 mg肽溶于120 mL 30% 乙腈/H<sub>2</sub>O中。加入40 g树脂(肽的正电荷的约100倍摩尔比)。将混合物溶液在室温下通过旋转搅拌混合1小时。将混合物溶液过滤,并用30% ACN/H<sub>2</sub>O将树脂洗涤5次。将初始溶液与经洗涤的溶液合并,并冻干。

[0022] 溶解度和化学稳定性

将SEQ ID NO: 2的化合物溶于H<sub>2</sub>O至10 mg/mL的浓度(肽含量),通过0.22 $\mu$ m过滤器

(Millex, SLGV004SL)过滤,并随后在缓冲液P5 (10 mM组氨酸、150 mM NaCl于H<sub>2</sub>O中, pH 5.0)或缓冲液P6 (10 mM组氨酸、150 mM NaCl于H<sub>2</sub>O中, pH 6.0)中稀释至1 mg/mL。将每一溶液转移至三个小瓶并高压灭菌。样品随后保持在4℃、30℃和40℃。在不同时间点目测评估样品的浊度和相分离。化合物的稳定性通过以下进行评估:分析型反相HPLC(RP-HPLC),在加热至60℃的Phenomenex Aeris Widepore, 3.6 μm, XB-C18 4.6 x 100 mm 柱(P/N 00D-4482-E0)上,以如下AB(A=0.05 % TFA/H<sub>2</sub>O; B= 0.04 % TFA/乙腈)梯度:5% B 等度的(isocratic),经5 min;5%至25% B,经20 min;25%至30% B,经30 min;以及30%至45% B,经10 min,以1.2 mL/min的流速(波长220 nm)。

[0023] 通过目测评估和通过RP-HPLC,在pH 5(缓冲液P5)和pH 6(缓冲液P6)下经4周,SEQ ID NO: 2的化合物在4℃、30℃和40℃下保持了良好的溶解度。物理形态为澄清至无色,无乳白色(opalescences)且无颗粒。如表1中所示,通过RP-HPLC回收是定量的。

[0024] 表1

缓冲液	总峰面积,第0天	4℃总峰面积,4周	30℃总峰面积,4周	40℃总峰面积,4周	30℃相对于4℃回收率,4周	40℃相对于4℃回收率,4周
P5	4903	4933	4932	4932	100%	100%
P6	4885	4918	4911	4960	100%	101%

[0025] 当在4℃、30℃和40℃下保持4周时,SEQ ID NO: 2的化合物也在pH 5(缓冲液P5)和pH 6(缓冲液P6)下保持了化学稳定性。如表2中所示,通过RP-HPLC评估样品表明在30℃相对于4℃下4周后,对于在pH 5(缓冲液P5)和pH 6(缓冲液P6)下两者,主峰改变小于1%;在40℃相对于4℃下4周后,在pH 5(缓冲液P5)下小于6%;和在40℃相对于4℃下4周后,在pH 6(缓冲液P6)下小于4%。

[0026] 表2

缓冲液	%主峰,第0天	4℃ %主峰	30℃ %主峰	40℃ %主峰
P5	99.55	98.01	97.07	92.64
P6	99.02	98.60	97.71	95.00

[0027] 使用硫磺素T结合测定的物理稳定性测试

原纤化是在水溶液中配制胰高血糖素时的常见问题。为了评估本发明的化合物的原纤化水平,进行了硫磺素T结合测定。

[0028] 在含有超小型搅拌棒(Fishers 目录号 1451364)的2.5 mL 平底Fisher小瓶(Fisher FS60965D)中,将SEQ ID NO: 2的化合物以1 mg/mL溶于各种测试缓冲液中。测试缓冲液于H<sub>2</sub>O中制备并全部调整至pH 6.0:

缓冲液1= 20 mM 组氨酸

缓冲液2= 10 mM 组氨酸,150 mM NaCl

缓冲液3= 10 mM 组氨酸,300 mM 山梨糖醇

缓冲液4= 10 mM 组氨酸,0.02% Tween 80

缓冲液5= 10 mM 组氨酸,300 mM精氨酸

缓冲液6= 10 mM 组氨酸,300 mM蔗糖。

[0029] 此外,将人胰高血糖素(SEQ ID NO: 1)溶于pH 2.8的12 mg/mL 甘油溶液中,至1 mg/mL的最终胰高血糖素浓度。于25℃,在设为300 rpm的磁力搅拌板上向全部样品施加机械应力。在时间点0、40和120小时取得不同样品的等分试样(每份等分试样为100 μL,并且一式三份进行),并加入平板中,然后加入10 μL的1 mM 硫磺素T (T35516-25G, Sigma

Aldrich)(H<sub>2</sub>O中的1 mM储备溶液,pH 2.8)。将样品温育30 min。使用Spectramax M5 (Molecular Devices)测量荧光:使用440 nm作为激发波长,并将发射波长设置于480 nm,具有475 nm的截止值和自动灵敏度调节。原始数据由Softmax Pro 5.4.1(Molecular Devices)采集并导入到Excel中。各时间点的三个孔平均值作为所报告的荧光单位示于下表3中:

表3

样品	t = 0 h	t = 40 h	t = 120 h
SEQ ID NO: 2于缓冲液1中	74.6	76.9	89.2
SEQ ID NO: 2于缓冲液2中	130.1	137.3	137.0
SEQ ID NO: 2于缓冲液3中	68.1	71.4	72.4
SEQ ID NO: 2于缓冲液4中	51.9	56.2	57.4
SEQ ID NO: 2于缓冲液5中	113.9	120.0	123.2
SEQ ID NO: 2于缓冲液6中	78.0	74.1	88.9
人胰高血糖素(SEQ ID NO: 1)于12 mg/mL甘油, pH 2.8中	37.9	620.4	1416.3
缓冲液1	33.4	36.4	34.2
缓冲液2	30.8	32.7	31.7
缓冲液3	34.5	36.5	36.2
缓冲液4	27.0	28.8	26.8
缓冲液5	43.8	46.1	44.7
缓冲液6	51.0	52.8	55.0
12 mg/mL甘油, pH 2.8	28.2	31.4	29.4

[0030] 如表3中所示,如通过目测评估和硫磺素T结合测定两者所评估的,SEQ ID NO: 2的化合物在存在机械应力的情况下,于25°C和pH 6下保持了物理稳定性。如通过硫磺素T结合测定所测量的,SEQ ID NO: 2的化合物未显示出原纤化。

#### [0031] 化合物对C57/B16雄性小鼠中血糖水平的影响

为了确定SEQ ID NO: 2的化合物对血糖水平的影响,向C57/B16小鼠施用该化合物。使用了三月龄的雄性C57/BL6小鼠(Harlan Laboratories)。将动物单独安置在有着12小时光/暗周期的温控(24°C)设施中,并随意饮食。在适应设施1周后,将小鼠随机分入各治疗组(n=4/组)。在缓冲液2中配制测试化合物(参见:使用硫磺素T结合测定的物理稳定性测试)。在测试的早晨,于08:00 AM 撤去食物。撤去食物后两小时,以0、1、3或10 µg/kg的剂量皮下给予测试化合物。于施用测试化合物后0、15、30、60和120分钟,用ACCU-CHECK®(Roche Diagnostics)血糖仪测量血糖。表4示出了不同时间点的葡萄糖值。结果以每组4只小鼠的平均值 ± 标准误差平均值(SEM)表示。

[0032] 对30分钟葡萄糖测量结果计算ED<sub>50</sub>。取10 µg/kg SEQ ID NO: 2的化合物的血糖水平作为最大值。对于SEQ ID NO: 2的化合物而言,ED<sub>50</sub>为3.28 µg/kg(95% 置信区间)。结果表明,SEQ ID NO: 2的化合物能够升高血糖。

表4

施用SEQ ID NO: 2的化合物后的血糖水平(mg/dL)				
时间(分钟)	0 $\mu\text{g/kg}$	1 $\mu\text{g/kg}$	3 $\mu\text{g/kg}$	10 $\mu\text{g/kg}$
0	141.0 $\pm$ 2.0	165.3 $\pm$ 16.7	148.0 $\pm$ 4.6	155.4 $\pm$ 10.1
15	185.1 $\pm$ 11.5	212.0 $\pm$ 12.6	234.1 $\pm$ 9.8	270.0 $\pm$ 12.7
30	193.5 $\pm$ 14.6	203.1 $\pm$ 13.1	242.1 $\pm$ 8.3	308.5 $\pm$ 2.6
60	170.8 $\pm$ 6.2	169.9 $\pm$ 10.1	169.4 $\pm$ 7.3	212.4 $\pm$ 8.3
120	140.2 $\pm$ 3.0	141.0 $\pm$ 4.2	148.2 $\pm$ 10.9	152.4 $\pm$ 1.5

[0033] 人胰高血糖素受体结合测定

通过使用过表达人胰高血糖素受体(hGR)的293HEK细胞系,测定SEQ ID NO: 2的化合物的结合(Lok S 等人Gene 140 (2), 203-209 (1994); GenBank:L20316)。

[0034] 使用来自悬浮或贴壁培养的细胞制备粗质膜。在冰上,将细胞沉淀于含有20  $\mu\text{g/ml}$  DNAase(Invitrogen, 18047-019)的低渗匀化缓冲液(25 mM Tris HCl pH 7.5、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 和不含EDTA的Roche Complete™ 抑制剂(Roche, 11873580001))中裂解。用玻璃杜恩斯匀浆器使用特氟隆(Teflon)研杵捣击25下而使细胞悬浮液匀浆化。将匀浆在1800 X g、4 °C下离心15 min。收集上清液并将沉淀重悬浮于低渗匀化缓冲液(不含DNAase)中并再次匀浆化。将混合物在1800 X g离心15 min。将第二次的上清液与第一次的上清液合并,并在1800 X g离心15 min以澄清。将此经过澄清的上清液于25000 X g、4°C下进一步离心30 min。将膜沉淀重悬浮于低渗匀化缓冲液(不含DNAase)中,并作为冷冻的等分试样保存于-80 °C直至使用。

[0035] 通过 $^{125}\text{I}$ -乳过氧化物酶程序将人胰高血糖素放射性碘化,并通过反相HPLC在Perkin-Elmer/NEN(NEX207)上纯化。比活性为约2200 Ci/mmol。由于 $^{125}\text{I}$ 标记的胰高血糖素材料中的高丙醇含量,所以通过同源竞争(homologous competition)而非饱和结合进行了 $K_D$ 测定。估计 $K_D$ 为1.24 nM,并用于计算所有测试的化合物的 $K_i$ 值。

[0036] 使用闪烁逼近测定法(SPA)进行了受体结合测定(Sun, S., Almaden, J., Carlson, T.J., Barker, J. 和 Gehring, M.R. Assay development and data analysis of receptor-ligand binding based on scintillation proximity assay. Metab Eng. 7:38-44 (2005)),采用之前由1% 无脂肪酸的牛血清白蛋白(BSA)(Gibco, 7.5% BSA)封闭的麦胚凝集素(WGA)珠粒(Perkin-Elmer)。将胰高血糖素(SEQ ID NO: 1)和化合物(SEQ ID NO: 2)以2 mM的浓度溶于二甲基亚砜(DMSO)中并冷冻保存于-20°C。

[0037] 将胰高血糖素和SEQ ID NO: 2的化合物连续稀释于DMSO中。将10  $\mu\text{L}$  经稀释的样品转移至含有40  $\mu\text{L}$  测定结合缓冲液(25 mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES) pH 7.4、2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1% 无脂肪酸BSA、0.003% Tween20和不含EDTA的Roche Complete抑制剂)或冷的胰高血糖素(在最终1  $\mu\text{M}$ 下的非特异性结合(NSB))的Corning 3632透明底测定板中。加入90  $\mu\text{L}$  膜(3  $\mu\text{g/孔}$ )、50  $\mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ 标记的胰高血糖素(在反应物中的最终浓度为0.15 nM)和50  $\mu\text{L}$  WGA珠粒(150  $\mu\text{g/孔}$ )。DMSO的浓度不超过4.2%。将平板密

封,翻转混合,并在室温下12小时的稳定时间(settling time)后用MicroBeta® 闪烁计数器读数。

[0038] 在存在化合物的情况下,将结果计算为特异性<sup>125</sup>I标记的胰高血糖素结合的百分比。通过<sup>125</sup>I标记的胰高血糖素的特异性结合百分比相对于所加入样品的浓度( $8.5 \times 10^{-12}$ 至 $0.5 \times 10^{-7}$  mol/L)的非线性回归,推导出了化合物的绝对IC<sub>50</sub>浓度。使用Cheng-Prusoff方程将IC<sub>50</sub>剂量转换成Ki(Cheng Y., Prusoff W. H., Biochem.Pharmacol.22: 3099-3108 (1973))。SEQ ID NO: 2的化合物针对hGR结合的Ki为 $0.397 \pm 0.062$  nM(n=7)(人胰高血糖素针对hGR结合的Ki为 $1.66 \pm 0.09$  nM(n=47))。此数据表明,SEQ ID NO: 2的化合物,相比人胰高血糖素,以增加的亲和力结合hGR,并且可活化该受体,继而引发依赖于胰高血糖素的生理应答。

#### [0039] 小鼠胰高血糖素受体结合测定

为了确定SEQ ID NO: 2的化合物是否结合小鼠胰高血糖素受体(mGR),进行了基本上如人胰高血糖素受体结合测定中所述的结合测定。从表达克隆的mGR的悬浮培养的293HEK细胞制备粗质膜。(Burcelin R, Li J, Charron MJ.Gene 164 (2), 305-10 (1995) GenBank: L38613)。如人胰高血糖素受体结合测定中所述制备膜沉淀,重悬浮于匀化缓冲液中并作为冷冻的等分试样保存于-80℃直至使用。

[0040] 通过<sup>125</sup>I-乳过氧化物酶程序将人胰高血糖素放射性碘化,并通过反相HPLC在Perkin-Elmer/NEN(NEX207)上纯化。比活性为约2200 Ci/mmol。由于<sup>125</sup>I标记的胰高血糖素材料中的高丙醇含量,所以通过同源竞争而非饱和结合进行了K<sub>D</sub>测定。估计K<sub>D</sub>为2.05 nM,并用于计算所有测试的化合物的Ki值。

[0041] 如人胰高血糖素受体结合测定中所述进行SPA受体结合测定并计算结果。SEQ ID NO: 2的化合物针对mGR结合的Ki为 $0.494 \pm 0.054$  nM(n=7)(人胰高血糖素针对mGR结合的Ki为 $1.37 \pm 0.07$  nM(n=33))。此数据表明,SEQ ID NO: 2的化合物相比于人胰高血糖素以增加的亲和力结合mGR,并且可活化该受体,继而引发依赖于胰高血糖素的生理应答。

#### [0042] 胰高血糖素样肽1受体结合测定

为了确定SEQ ID NO: 2的化合物是否结合人胰高血糖素样肽1受体(hGLP-1R),进行了基本上如人胰高血糖素受体结合测定中所述的结合测定。从表达克隆的人胰高血糖素样肽1受体(hGLP-1R)的293HEK悬浮细胞制备粗质膜(Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun.196 (1):141-6 (1993) GenBank:NM\_002062),所述克隆的人胰高血糖素样肽1受体(hGLP-1R)分离自293HEK膜。如人胰高血糖素受体结合测定中所述制备膜沉淀,重悬浮于匀化缓冲液中并作为冷冻的等分试样保存于-80℃直至使用。

[0043] 胰高血糖素样肽1酰胺(GLP-1酰胺)(SEQ ID NO: 3)通过<sup>125</sup>I-乳过氧化物酶程序进行放射性碘化,并通过反相HPLC在Perkin-Elmer/NEN(NEX308)上纯化。比活性为约2200 Ci/mmol。由于<sup>125</sup>I标记的GLP-1材料中的高丙醇含量,所以通过同源竞争而非饱和结合进行了K<sub>D</sub>测定。估计K<sub>D</sub>为0.329 nM,并用于计算所有测试的化合物的Ki值。

[0044] 如人胰高血糖素受体结合测定中所述进行SPA受体结合测定并计算结果,例外是使用经放射性碘化的GLP-1酰胺而非人胰高血糖素受体结合测定的经放射性碘化的胰高血糖素。

[0045] SEQ ID NO: 2的化合物针对hGLP-1R结合的 $K_i$ 为 $1221 \pm 78 \text{ nM}$ ( $n=6$ ),且胰高血糖素(SEQ ID NO:1)的 $K_i$ 为 $2098 \pm 91$ ( $n=17$ )(人GLP-1 7-36酰胺针对hGLP-1R结合的 $K_i$ 为 $0.427 \pm 0.169 \text{ nM}$ ( $n=64$ ))。此数据表明,SEQ ID NO: 2的化合物以低亲和力结合hGLP-1R,并因而不会起始GLP-1R介导的生理应答。

[0046] 葡萄糖依赖性促胰岛素肽受体结合测定

为了确定SEQ ID NO: 2的化合物是否结合葡萄糖依赖性促胰岛素肽受体(GIP-R),进行了基本上如人胰高血糖素受体结合测定中所述的结合测定。使用来自悬浮培养的细胞从表达人GIP-R的悬浮中国仓鼠卵巢细胞(CHO-S)(Usdin, T.B., Gruber, C., Modi, W. 和 Bonner, T.I., GenBank: AAA84418.1)中制备粗质膜。如人胰高血糖素受体结合测定中所述制备膜沉淀,重悬浮于匀化缓冲液中并作为冷冻的等分试样保存于 $-80^\circ\text{C}$ 直至使用。

[0047] GIP(SEQ ID NO: 4)经I-125-乳过氧化物酶程序进行放射性碘化(Markalonis, J.J., Biochem. J. 113:299 (1969)),并通过反相HPLC在Perkin-Elmer/NEN(NEX402)上纯化。比活性为 $2200 \text{ Ci/mmol}$ 。使用冷的人GIP通过同源竞争而非饱和结合进行了 $K_D$ 测定。估计 $K_D$ 为 $0.174 \text{ nM}$ ,并用于计算所有测试的化合物的 $K_i$ 值。

[0048] 如人胰高血糖素受体结合测定中所述进行SPA受体结合测定并计算结果,例外是使用经放射性碘化的GIP而非人胰高血糖素受体结合测定的经放射性碘化的胰高血糖素。

[0049] SEQ NO: 2的化合物针对人GIP-R结合的 $K_i$ 为 $1054 \pm 167 \text{ nM}$ ( $n=7$ ),且胰高血糖素(SEQ ID NO: 1)的 $K_i$ 为 $>3010$ ( $n=1$ )(人GIP 1-42的 $K_i$ 为 $0.279 \pm 0.021 \text{ nM}$ , $n=2$ )。此数据表明,SEQ ID NO: 2的化合物以低亲和力结合hGIP-R,并因而不会起始hGIP-R介导的生理应答。

[0050] 人胰高血糖素受体刺激的cAMP功能测定

hGR刺激的cAMP功能测定使用与用于人胰高血糖素受体结合测定中以上所述的hGR结合测定相同的克隆的hGR表达细胞系。用胰高血糖素、缓冲液对照或测试样品刺激细胞,并使用CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF 测定试剂盒(62AM4PEC)对细胞内生成的cAMP进行定量。简而言之,在存在细胞裂解缓冲液的情况下,通过与cAMP-d2捕获抗体的结合来检测细胞内的cAMP水平。加入该试剂盒中提供的第二检测抗体,抗cAMP穴状化合物,以建立竞争性夹心测定。当该检测抗体复合物形成时,在Perkin-Elmer Envision® 仪器上测得的信号会增强。

[0051] 用无酶细胞解离溶液(专门培养基5-004-B)从近汇合的组织培养皿中收集hGR-HEK293细胞。将细胞在 $100 \times \text{g}$ 、室温下沉淀5分钟,然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤两次。将洗涤后的细胞沉淀以 $1 \times 10^7$ 个细胞/ml 重悬浮于Recovery™ 冷冻培养基(Gibco 2044)中并冷冻在液氮中。在治疗当天,将冷冻的细胞等份试样转移至经预热的重悬浮细胞培养基(DMEM, Gibco(31053P),含有0.5% 确定的FBS(Hyclone SH30070);20 mM HEPES, pH 7.4; 以及2 mM 谷氨酰胺)中。然后将细胞在 $100 \times \text{g}$ 、室温下沉淀5分钟。移除上清液并将细胞沉淀以 $1.25 \times 10^5$ 个细胞/ml重悬浮于细胞培养基(DMEM, Gibco(31053P),含有0.1% 无脂肪酸的牛血清白蛋白,BSA,7.5%,(Gibco 15620);20 mM HEPES, pH 7.4,以及2 mM 谷氨酰胺)中。将测试样品制备成2 mM 储备溶液(DMSO中)并冷冻于 $-20^\circ\text{C}$ 直至需要时。将胰高血糖素、缓冲液对照和SEQ ID NO: 2的化合物连续稀释于DMSO中,然后为递减(step-down)稀释于化合物稀释培养基(含有 $500 \text{ }\mu\text{M}$  IBMX的测定培养基(DMEM, Gibco 31053P,含有0.1% 无脂

肪酸的牛血清白蛋白,BSA,7.5%,(Gibco 15620);20 mM HEPES,pH 7.4,以及2 mM 谷氨酰胺))中。反应以40  $\mu$ L通过如下进行:向96孔板半区域黑色平板(Costar 3694)中加入20  $\mu$ L的细胞(2500个细胞/孔)或cAMP标准曲线样品,然后加入20  $\mu$ L化合物稀释培养基中的2X浓缩的胰高血糖素、缓冲液对照或SEQ ID NO: 2的化合物。最终的DMSO浓度不超过1.1%,而最终的IBMX浓度为250  $\mu$ M。通过加入20  $\mu$ L 稀释于CisBio裂解缓冲液中的cAMP-d2-捕获抗体(CisBio)来终止反应,然后在TITERTEK摇床中轻轻混合。裂解5分钟后,加入20  $\mu$ L检测抗体、抗cAMP穴状化合物(CisBio),并以600 rpm混合1分钟,随后以300 rpm摇动。1小时后,在室温下,使用Perkin-Elmer Envision® 读取经裂解的细胞与抗体混合物。使用cAMP标准曲线将Envision® 单位转换成 $\rho$ mol/L cAMP/孔。将各孔中生成的cAMP的皮摩尔转换成用胰高血糖素对照观测到的最大应答的百分比。使用最大应答的百分比相对于所加入肽的浓度( $0.17 \times 10^{-12}$ 至 $1 \times 10^{-8}$  M),通过非线性回归分析推导出相对EC<sub>50</sub>值。

[0052] SEQ ID NO: 2的化合物以 $0.0356 \pm 0.0071$  nM(n=8)的EC<sub>50</sub>结合hGR(人胰高血糖素的EC<sub>50</sub>为 $0.0142 \pm 0.0018$  nM,n=6)。此数据表明,SEQ ID NO: 1的化合物结合并活化hGR,并且从而可以起始胰高血糖素受体介导的生理应答。

#### [0053] 序列表

人胰高血糖素:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1)

实施例1:

His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2)

人GLP-1:

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3)

人GIP:

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln (SEQ ID NO: 4)



<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (16)..(16)

<223> 位置16处的Xaa是2-氨基异丁酸

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40)..(40)

<223> 酰胺化

<400> 2

His	Ala	Gln	Gly	Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Xaa
1				5					10					15	

Lys	Lys	Ala	Gln	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Lys	Thr	Gly	Pro	Ser
		20					25						30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Lys	Ser	Lys
	35				40		

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> 酰胺化

<400> 3

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

